昆虫天然免疫反应分子机制研究进展

张明明，初　源，赵章武*，安春菊*
（中国农业大学农学与生物技术学院，北京 100193）

摘要：昆虫体内缺乏高等脊椎动物所具有的获得性免疫系统，只能依赖发达的天然免疫系统抵抗细菌、真菌、病毒等外源病原物的侵染。本文概括了昆虫天然免疫反应发生和作用的分子机制相关进展，重点阐述了重要免疫相关因子在昆虫天然免疫反应中的功能和作用机制。昆虫天然免疫反应分为体液免疫和细胞免疫两种，二者共同作用完成对病原物的吞噬（phagocytosis）、集结（nodulation）、包囊（encapsulation）、凝结（coagulation）和黑化（melanization）等。当昆虫受到外界病原物的侵染时，首先通过体内的模式识别蛋白（pattern recognition proteins/receptor, PRPs）识别并结合病原物表面特有的模式分子（pathogen-associated molecular pattern, PAMPs），继而一系列包括丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶抑制剂在内的级联激活反应被激活和调控，产生抗菌肽、黑色素等免疫效应分子，清除或杀灭外源物。抗菌肽是一类小分子量的阳离子肽，具有广谱抗菌活性，针对不同类型的病原物，抗菌肽的产生机制也不尽相同。昆虫体内存在着两种信号转导途径调节抗菌肽的产生：一是由真菌和大部分革兰氏阳性菌激活的 Toll 途径；二是由革兰氏阴性菌激活的 Imd 途径（immune deficiency pathway）。这两个途径通过激活不同转录因子调控不同抗菌肽基因的表达参与昆虫体内的天然免疫反应。

关键词：昆虫；天然免疫；体液免疫；细胞免疫；分子机制
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)10-1221-09

Progress in the molecular mechanisms of the innate immune responses in insects

ZHANG Ming-Ming, CHU Yuan, ZHAO Zhang-Wu*, AN Chun-Ju* (College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Insects lack acquired immune system processed by vertebrates, and rely solely on developed innate immune system to defend against the infection from alien pathogens such as bacteria, fungi, or virus and so on. In this article, we review the progress in the molecular mechanisms of the development and action of the innate immune responses in insects, especially focusing on the roles and functioning mechanisms of some important immune-related molecules. The innate immune response in insects is divided into humoral immunity and cellular immunity. They function together to kill and eliminate the pathogens via phagocytosis, nodulation, encapsulation, coagulation, and melanization. When the insects are infected by the alien pathogens, the pattern recognition proteins/receptor (PRPs) in insects would firstly recognize and combine with pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) in the pathogens, and then initiate the activation and regulation of a series of innate immune response containing immune-related serine proteases and serine protease inhibitors, and finally trigger the production of the immune effectors, such as antimicrobial peptides, melanin and so on, to kill the alien pathogens. The antimicrobial peptides are a kind of cationic peptides with low molecular weight, and have a broad spectrum of antimicrobial activity. They are produced via various mechanisms based on the types of invading pathogens. There are two signal transduction pathways regulating the production of antimicrobial peptides: Toll pathway activated by fungi and most of gram-positive bacteria, and Imd pathway initiated by gram-negative bacteria. These two pathways are contributed to the expression of different antimicrobial peptides due to the activation of different transcription factors.

Key words: Insect; innate immune response; humoral immunity; cellular immunity; molecular mechanisms

基金项目：国家自然科学基金项目（31172090）；新世纪优秀人才支持计划项目（NCET-11-0476）
作者简介：张明明，女，1987 年 3 月生，山东聊城人，硕士研究生，主要从事昆虫天然免疫反应研究，E-mail：zhangmingming4321@126.com
*通讯作者 Corresponding authors, E-mail：zhaozw@cau.edu.cn；anchunju@cau.edu.cn
收稿日期 Received：2012-06-14；接受日期 Accepted：2012-10-08

昆虫是地球上分布最广，种类最多的种群，一般生活在充满各种病原性微生物的环境中。昆虫体内缺乏高等脊椎动物所具有的获得性免疫系统，但是它们能成功抵御生活环境中各种病原物的侵染成功繁衍后代，得益于昆虫具有发达的天然免疫系统。昆虫的天然免疫反应包括细胞免疫和体液免疫，它们既有区别又相互联系，共同作用抵御病原物的入侵。在这两种免疫反应中，第一步都依赖于昆虫对病原物的识别，然后激活昆虫体内相应的信号通路从而引发强烈的天然免疫反应。本文将针对昆虫天然免疫反应发生和作用的分子机制相关进展做一综述，重点阐述天然免疫反应中涉及的一系列免疫相关分子的功能和作用机制。

1 昆虫天然免疫反应的识别机制

无论是昆虫的体液免疫还是细胞免疫，都依赖于昆虫对病原物的识别。这一过程是通过昆虫体内的模式识别蛋白(pattern recognition proteins/receptors, PRPs)识别并结合病原物表面特有的模式分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)来实现的(Hughes, 2012)。革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖(liposaccharide, LPS)、革兰氏阳性细菌表面的肽聚糖(peptidoglycan, PGN)、真菌的β-1,3-葡聚糖(β-1,3-glucan)以及一些入侵细菌释放的蛋白酶甚至受损细胞释放的核酸都可以作为外源物被昆虫的模式识别蛋白识别(Jiang *et al*., 2010)。

昆虫模式识别蛋白在病原物入侵前通常分布在脂肪体细胞以及血淋巴细胞表面，或者游离在昆虫的血淋巴中。不同的模式识别蛋白具有不同的结构和功能，识别并结合不同的病原物模式分子。目前已经鉴定的类别主要包括β-1,3-葡聚糖识别蛋白(β-1,3-glucan recognition protein, βGRP)或革兰氏阴性细菌结合蛋白(gram-negative bacteria binding proteins, GNBPs)、肽聚糖识别蛋白(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs)、类免疫球蛋白(hemolin)、C型凝集素(C-type lectins)、整联蛋白(integrins)以及载脂蛋白家族成员 Apolipophorin Ⅲ(ApoLp-Ⅲ)等(Jiang *et al*., 2010; Hughes, 2012)。下面就这些主要模式识别蛋白的功能和识别机制分别进行描述。

1.1 β-1,3-葡聚糖识别蛋白和革兰氏阴性细菌结合蛋白

这两种识别蛋白实际上是同一类模式识别蛋白的两种不同名称，在其他生物中也被称为脂多糖-β-1, 3-葡聚糖识别蛋白。这类蛋白都含有相同的结构域，在氨基末端均带有葡聚糖结合区，羧基末端均有一段类似于β-1, 3-葡聚糖酶的区域。β-1, 3-葡聚糖识别蛋白和革兰氏阴性细菌结合蛋白都能结合革兰氏阴性菌，但是结合的位点略有区别：前者能够识别并结合真菌细胞壁的β-1, 3-葡聚糖，而后者结合革兰氏阴性菌上的脂多糖。例如，家蚕 *Bombyx mori* βGRP1，烟草天蛾 *Manduca sexta* βGRP1 和 βGRP2 以及印度谷螟 *Plodia interpunctella* βGRP 能够识别并结合β-1, 3-葡聚糖从而激活体内的酚氧化酶级联反应(Ochiai and Ashida, 1988; Ma and Kanost, 2000; Fabrick *et al*., 2004; Jiang *et al*., 2004)。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* GNBP1 能够识别革兰氏阴性菌的脂多糖进而通过体内的天然免疫信号途径诱导抗菌肽基因的表达(Kim *et al*., 2000)。

1.2 肽聚糖识别蛋白

该识别蛋白首先在家蚕中被鉴定出来，随后陆续在烟草天蛾、黑腹果蝇、印度谷螟、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等昆虫中被分离或克隆。昆虫 PGRPs 在脂肪体、表皮以及肠中合成并分泌，还有一小部分来自于血淋巴细胞(Hughes, 2012)。PGRPs 可分为短型 PGRP (PGRP-S)和长型 PGRP (PGRP-L)两种类型。PGRP-S 是一类小分子分泌性蛋白，PGRP-L 是一类跨膜蛋白或胞内蛋白。对果蝇和按蚊 *Anopheles albimanus* 的基因组进行分析表明：果蝇体内分为长型 PGRP(-LA, LB, LC, LD, LE 和 LF)以及短型 PGRP(-SA, SB1, SB2, SC1A, SC1B, SC2 和 SD)，存在 13 个基因座，通过可变剪接最多能够编码 17 种 PGRP (Werner *et al*., 2000)；在按蚊中存在 7 个基因座(Montaño *et al*., 2011)。两种类型的 PGRP 羧基末端都含有一个与细菌Ⅱ型酰胺酶同源的约 165 个氨基酸残基的 PGRP 结构域(Basbous *et al*., 2011)。PGRPs 就是通过该结构域与细菌表面的肽聚糖分子结合，激活天然免疫反应中的 Toll 和 Imd 信号途径继而诱导抗菌肽的表达(例如果蝇 PGRP-SA 和 PGRP-LE 等)(Kaneko and Silverman, 2005)，也可以激活酚氧化酶原产生黑化反应(例如烟草天蛾 PGRP1 和 PGRP2 等)(Sumathipala and Jiang, 2010)，还可以促进吞噬作用(例如果蝇 PGRP-SA 等)(Kaneko and Silverman, 2005)。

1.3　类免疫球蛋白

这类蛋白迄今为止仅在鳞翅目昆虫体内发现。同哺乳动物的免疫球蛋白类似，昆虫类免疫球蛋白由 4 个免疫球蛋白结构域组成，是由昆虫体内的脂肪体合成的。该蛋白不仅能促进血淋巴细胞之间的结合，还能结合革兰氏阳性和阴性细菌（姚慧鹏和吴小锋，2008 ）。例如，在烟草天蛾的幼虫中通过 RNAi 抑制类免疫球蛋白基因的表达，结果表明虫体对大肠杆菌的吞噬和集结能力显著降低（Eleftherianos *et al.*，2007）。在惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 中，类免疫球蛋白能够结合细菌的脂多糖，进而激活蛋白激酶 C，引发细胞的吞噬作用（Daffre and Faye，1997）。此外，类免疫球蛋白可能还有抗病毒的功能，但是具体作用机制尚不清楚。

1.4　C 型凝集素

这是一类含有一个或两个糖识别结构域（carbohydrate recognition domain，CRD）的钙依赖性糖结合蛋白。目前在烟草天蛾、家蚕、美国白蛾 *Hyphantria cunea*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、果蝇中均检测到 C 型凝集素的存在。除了在鳞翅目昆虫中已报道的 C 型凝集素都含有两个糖识别结构域，其他昆虫中发现的 C 型凝集素大多只含有 1 个糖识别结构域。例如在果蝇中有 30 多种 C 型凝集素，多数只含有 1 个结构域。C 型凝集素能与细菌表面的脂多糖或者脂磷壁酸（lipoteichoic acid）结合，从而引起细菌、酵母等微生物的凝集。此外，C 型凝集素还会促进昆虫体内酚氧化酶原的激活和黑色素在外源物表面的沉积（宁媛媛等，2009）。例如，向烟草天蛾体内注射 C 型凝集素 2（IML-2）抗体降低血淋巴中 IML-2 的蛋白水平时，发现血淋巴对革兰氏阴性菌的清除作用显著降低，说明 IML-2 参与了烟草天蛾对革兰氏阴性菌的清除（Jiang *et al.*，2003）。此外，研究还表明 IML-2 还能增加血淋巴细胞的包囊和黑化作用（Yu and Kanost，2004）。

1.5　整联蛋白

它是一种在多细胞动物中广泛存在的表面蛋白，能够识别并结合特异细胞表面或胞外基质或可溶蛋白的 RGD（Arginine-Glycine-Aspartic acid）中心（精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三联体），进而引发免疫反应。在地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 中，整联蛋白参与了血淋巴细胞对细菌的吞噬作用（Lamprou *et al.*，2007）。在烟草天蛾中，整联蛋白可刺激血淋巴细胞的粘连进而对病原物进行包囊（Zhuang *et al.*，2007）。

1.6　Apolipophorin Ⅲ（ApoLp-Ⅲ）

它与先前发现的 ApoLp-Ⅰ和-Ⅱ同属于载脂蛋白家族，是具有水溶性、热稳定性及疏水性的蛋白。三者都具有转运脂类物质的功能，但是只有 ApoLp-Ⅲ在昆虫免疫中发挥作用（Hoffmann *et al.*，1999）。当注射适当量的 ApoLp-Ⅲ时，烟草天蛾的抗菌和溶菌能力增强，并且刺激了血淋巴细胞的吞噬作用（Sun *et al.*，1995）。纯化的大蜡螟 *Galleria mellonella* ApoLp-Ⅲ能结合脂磷壁酸、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌孢子、β-1,3-葡聚糖和脂多糖等，说明昆虫 ApoLp-Ⅲ具有模式识别蛋白的功能（Leon *et al.*，2006）。但是 ApoLp-Ⅲ在昆虫免疫信号通路中的具体作用机制尚需进一步的研究。

2　昆虫细胞免疫的发生机制

一旦入侵信号被昆虫的模式识别蛋白识别后，昆虫体内的天然免疫反应被迅速激发继而产生效应分子（effectors）以清除外源物。昆虫的天然免疫反应分为细胞免疫和体液免疫两种。昆虫细胞免疫是由血淋巴细胞（hemocytes）介导完成的，目前对昆虫细胞免疫发生机制的研究较少，也主要是因为收集鉴定血淋巴细胞比较困难。此外，每种昆虫具有的血淋巴细胞种类不完全相同，且相同功能的血淋巴细胞在不同昆虫中命名也较为混乱。例如，果蝇体内有 5 种血细胞，其中主要的 3 种血淋巴细胞分别是浆细胞（plasmatocytes）、薄层细胞（lamellocytes）和晶细胞（crystal cells）（Lanot *et al.*，2001）；烟草天蛾、家蚕、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 等鳞翅目昆虫有 4 种血淋巴细胞——浆细胞、粒细胞（granular cells）、类绛色细胞（oenocytoids）和球形细胞（spherule cells）（Zhuang *et al.*，2007）。浆细胞是血淋巴细胞中最多的一种，在对入侵病原物的吞噬作用中发挥重要作用，其他参与昆虫细胞免疫的血淋巴细胞在不同的昆虫中可能不完全一样。

虽然参与的血淋巴细胞种类可能不一样，但是细胞免疫在不同昆虫中大致都包括吞噬作用（phagocytosis）、集结作用（nodulation）和包囊作用（encapsulation），下面就这几种作用的发生机制做一简要介绍。

2.1　吞噬作用

它是进化上保守的用于清除入侵病原体和细胞

凋亡残体的机制，这个过程由单个细胞完成，包括识别、吞噬、对入侵病原体的破坏和细胞本身的衰竭死亡等步骤(Williams, 2007)。吞噬作用是一个极其复杂多样的过程，它需要噬菌细胞与病原体之间多重的连续反应以及逐级信号传导才能完成。只有当噬菌细胞表面的受体被靶细胞激活后，才会发生吞噬作用。血淋巴细胞对不同细菌的反应是不同的。例如，埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的血淋巴细胞对大肠杆菌 *Escherichia coli* 和疟原虫孢子体(*Plasmodium* sporozoite)产生吞噬作用，但对藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 只产生黑化反应(Hernandez-Martinez *et al*., 2002)。果蝇幼虫的浆细胞能够识别并吞噬入侵的病原微生物以及体内的凋亡细胞，长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 的浆细胞能够吞噬大肠杆菌，也能使其黑化，但对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 仅显示很强的黑化作用。此外，不同的病原物引起的吞噬反应的程度也不相同。例如，在地中海实蝇和埃及伊蚊中都发现对大肠杆菌比对金黄色葡萄球菌的吞噬速度更快(Levashina *et al*., 2001; Lamprou *et al*., 2007)。这说明在昆虫体内可能存在着几种不同的分子机制调节着细胞的吞噬作用。

2.2 集结作用和包囊作用

集结是指很多血淋巴细胞粘附、聚集在细菌等外来物的表面。包囊与集结相同，只是包囊的对象体积更大，包括寄生物、原生动物、线虫等(Marmaras and Lampropoulou, 2009)。与吞噬作用将外源体陷在单个细胞里不同，集结和包囊作用是血淋巴细胞在外源体的周围层层叠加形成一个"鞘"将异物包围住，被包围在囊中的入侵物就会被昆虫自身产生的自由基 ROS 和 RNS 杀死，或在囊中窒息而死(Nappi and Ottaviani, 2000)。例如，在果蝇体内，当受到外源病原物入侵时，果蝇体内大而扁平的薄层细胞(lamellocytes)就会在病原物周围形成包囊(Hultmark, 2003)。集结和包囊作用常常伴随着对异物的黑化作用(一种重要的体液免疫反应，详细描述见下文)。在集结和包囊作用中，一旦外来异物被识别，结节和包囊的形成就依赖于将非粘附性的血淋巴细胞变成具有粘附性的血淋巴细胞。细胞粘附态的形成需要一些细胞因子的参与。粘虫 *Leucania separata* ENF 肽、烟草天蛾浆细胞扩散肽(plasmatocyte spreading peptide)、大豆夜蛾 *Pseudoplusia includens* 和烟草天蛾整联蛋白等都被认为是促进浆细胞粘附的细胞因子(Lavine and Strand, 2002; Jiang *et al*., 2010)。

3 昆虫体液免疫反应的发生机制

当外界病原物进入昆虫体内被模式识别受体蛋白识别后，除了引发上面提到的昆虫细胞免疫反应以外，还会同时引发另外一种重要的天然免疫反应——体液免疫。参与体液免疫的蛋白分子(例如丝氨酸蛋白酶等)以及体液免疫产生的效应分子(例如抗菌肽等)大部分是由昆虫脂肪体(fat body)产生的，也有一部分是由血细胞产生的。主要有两种反应参与了昆虫的体液免疫，一是由丝氨酸蛋白酶参与的凝结(coagulation)与黑化反应(melanization)，二是能诱导抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)产生的 Toll 和 Imd 途径。下面仅就这两种主要反应类型的产生机制做一简要介绍。

3.1 凝结与黑化反应

为了防止外界伤害造成的血淋巴流失，昆虫体内形成了高效的血淋巴凝结机制。目前关于凝结反应的发生机制在马蹄鲎 *Tachpleus tridentatus* 中研究得最为清楚，研究表明病原物表面的脂多糖和 β-1,3-葡聚糖被模式识别蛋白识别以后，引发了马蹄鲎体内包括 Factor B, Factor C 和 Factor G 在内的一系列丝氨酸蛋白酶的级联反应，最终凝血酶原(pro-clotting enzyme)被激活，进而导致血淋巴的凝结(Muta and Iwanaga, 1996; Iwanaga *et al*., 1998)。

黑化反应中也包含了丝氨酸蛋白酶的顺序级联激活。该反应能导致黑色素(melanin)的形成，在抵御病原物入侵、促进伤口愈合以及形成结节与包囊的过程中起着重要的作用(Lavine and Strand, 2001, 2003; Mavrouli *et al*., 2005; Jiang *et al*., 2010)。酚氧化酶(phenoloxidase, PO)是黑色素形成的关键酶，在分子氧存在条件下，酚氧化酶能把单酚类物质氧化成邻苯二酚，进而再氧化成邻苯醌或对苯醌，最终再聚合成黑色素。酚氧化酶在没有外源物刺激的情况下是以酶原(prophenoloxidase, PPO)的形式在类绛色细胞中合成的，释放到血淋巴后需要被特异蛋白酶切割激活才能成为有活性的酚氧化酶(An *et al*., 2009; Jiang *et al*., 2010)。该激活过程依赖于包含多个丝氨酸蛋白酶在内的级联激活途径。丝氨酸蛋白酶是一类结构保守、功能多样的蛋白酶，其氨基端含有 1 ~ 2 个具有保守二硫键的发夹结构域(clip domain)，羧基端含有一个类似于胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶的由组氨酸-天冬氨

酸-丝氨酸(His-Asp-Ser)催化三角组成的催化结构域(catalytic domain)(Jiang and Kanost, 2000)。丝氨酸蛋白酶本身也是以酶原的形式在脂肪体或血淋巴细胞中合成，需要在特异的激活位点被上游蛋白酶切割激活进而去激活同一途径的下游蛋白酶(Jiang and Kanost, 2000; Jiang *et al.*, 2010)。目前在果蝇、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、家蚕、黄粉虫 *Tenebrio molitor*、烟草天蛾、东北大黑鳃金龟 *Holotrichia diomphalia* 等昆虫中都鉴别到有功能的丝氨酸蛋白酶，但是对参与黑化作用的丝氨酸蛋白酶途径还是在鳞翅目昆虫尤其是烟草天蛾和家蚕中研究得最为清楚。下面将主要以烟草天蛾为例详细描述黑化反应的发生机制。

目前在烟草天蛾和家蚕中分别克隆到 14 和 15 个具有发夹结构的丝氨酸蛋白酶基因。在烟草天蛾酚氧化酶酶原激活途径中，至少包含了 7 种丝氨酸蛋白酶。当烟草天蛾幼虫被大肠杆菌或藤黄微球菌或真菌细胞壁组分 β-1,3-葡聚糖刺激后，在一条通路中外源入侵信号被 β-1,3-葡聚糖识别蛋白识别，然后丝氨酸蛋白酶 HP14 的酶原(proHP14)被激活(Jiang *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2005)。果蝇和黄粉虫中，与烟草天蛾 HP14 同源的蛋白酶也是位于所在级联反应的起始位置。HP14 酶原被激活后，接着去激活另一种丝氨酸蛋白酶 HP21 的酶原(proHP21)，最后酚氧化酶原激活酶 2 和 3 (prophenoloxidase activating protease-2/3, PAP-2/3)被 HP21 激活(Gorman *et al.*, 2007; Wang and Jiang, 2007)。至此，烟草天蛾酚氧化酶原将被 PAP-2 和/或 PAP-3 激活进一步导致黑色素的形成，完成黑化反应。在另一条通路中，外源物被识别后，未知的蛋白酶激活丝氨酸蛋白酶 HP6 的酶原(proHP6)，HP6 可以再激活另外一种酚氧化酶原激活酶 1 (PAP-1)，进而激活酚氧化酶原(图 1)(An *et al.*, 2009)。目前在其他昆虫中鉴定到的酚氧化酶原激活酶还包括黄粉虫的 SPE、冈比亚按蚊的 CLIPB9、棉铃虫的 PPAE1、家蚕的 PPAE、东北大黑鳃金龟的 PPAF1 等(An *et al.*, 2011)。黑化反应除了能杀灭外源物外，反应过程也会产生一些诸如氧自由基等对自身有害的物质，因此需要被严格地调控。丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitors, serpins)是潜在调控丝氨酸蛋白酶的抑制剂，一般由 350～400 个氨基酸残基组成，含有 3 个标准的 β-折叠(β-sheet A－C)、9 个 α-螺旋(α-helices)和 1 个暴露在分子表面的位于羧基末端的反应中心环(reactive center loop, RCL)。丝氨酸蛋白酶抑制剂的靶标蛋白酶在其反应中心环中的裂解键(scissile bond)切割并与之形成紧密的高分子量复合物，从而被相应的丝氨酸蛋白酶抑制剂不可逆地抑制(Gettins, 2002)。目前已经在许多昆虫中鉴定到丝氨酸蛋白酶抑制剂的存在，部分丝氨酸蛋白酶抑制剂的生理生化功能在鳞翅目昆虫，尤其是在烟草天蛾体内已有了广泛的研究。从烟草天蛾中鉴定到 7 个丝氨酸蛋白酶抑制剂基因，分别是 serpin1－7，其中 serpin1 含有 12 个可变剪切导致的亚型(isoforms)：serpin1A-1K 和 serpin-1Z (Jiang and Kanost, 1997; Kanost, 1999)。在上述的酚氧化酶激活途径中，HP21 被 serpin-4 调控，HP6 被 serpin-5 调控，PAP1－3 均可被 serpin-3 和 serpin-1J 抑制(图 1)(Zhu *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005; An and Kanost, 2010; An *et al.*, 2011)。

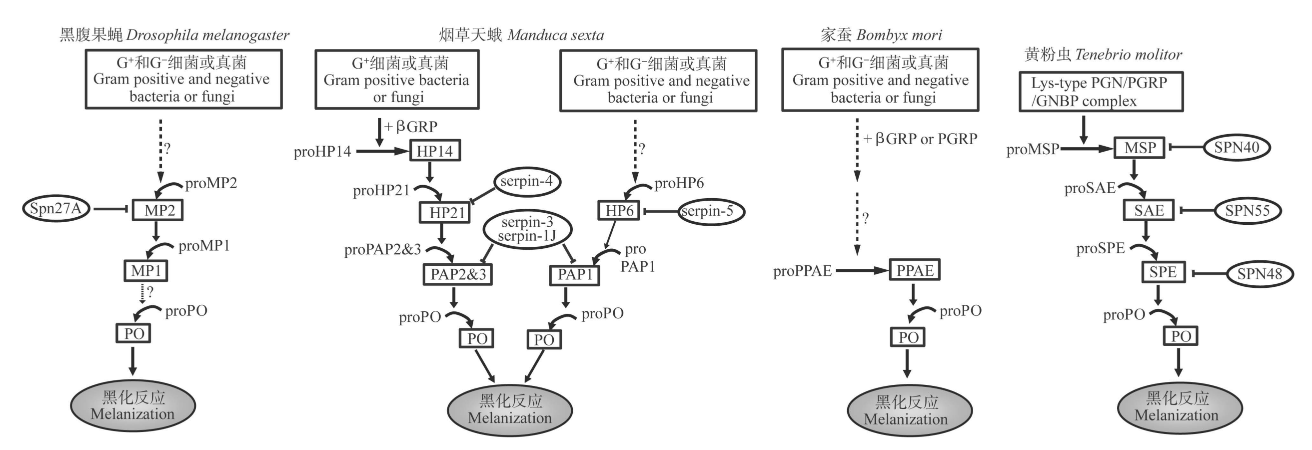


图 1　黑腹果蝇、烟草天蛾、家蚕和黄粉虫中黑化反应发生和调控的分子机制(改自 An *et al.*, 2009)

Fig. 1　Molecular mechanisms of melanization in *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Bombyx mori* and *Tenebrio molitor* (Adapted from An *et al.*, 2009)

3.2 抗菌肽的产生

昆虫体液免疫能够产生抗菌肽，这是昆虫体液免疫最主要的特点。抗菌肽是一类小分子量的阳离子肽，具有广谱抗菌活性，主要由脂肪体细胞合成，各种上皮细胞、生殖道、马氏管和气管等也能产生(Nappi and Ottaviani, 2000)。针对不同类型的病原物，抗菌肽的产生机制也不尽相同。昆虫体内存在着两种信号转导途径调节抗菌肽的产生：一是由真菌和大部分革兰氏阳性菌激活的 Toll 途径，二是由革兰氏阴性菌激活的 Imd 途径 (immune deficiency pathway)。这两种途径通过激活不同转录因子来调控不同抗菌肽基因的表达(Aggarwal and Silverman, 2008)。目前对抗菌肽的产生机制研究得最清楚的还是黑腹果蝇，下面仅以该昆虫为例介绍 Toll 和 Imd 这两种途径，也会兼顾其他昆虫关于抗菌肽产生的最新研究进展。

3.2.1 Toll 途径：该途径的基本组成成分是跨膜受体 Toll 和胞内适配器 Tube 和 Myd88。在 Toll 途径中，可溶性肽聚糖识别蛋白 PGRP-SA 和 GNBP1 识别病原体后，将信号传导给一个包含 Persephone (Psh)等丝氨酸蛋白酶在内的水解级联过程，最后导致细胞因子样多肽(Spätzle, Spz)在羧基末端被切割，产生一个含半胱氨酸结(cystine knot)的羧基末端，与细胞膜上的 Toll 受体结合，诱发 Toll 的构象发生改变，随之导致至少 3 种胞浆蛋白(Myd88, Tube 和 Pelle)的聚集(Lemaitre and Hoffmann, 2007; Aggarwal and Silverman, 2008; Jiang *et al*., 2010)。Pelle 再促使抑制因子 Cactus 发生磷酸化和蛋白水解，从而与 NF-κB 转录因子 Dorsal 和 Dif 分离。被释放的 Dorsal 和 Dif 进一步转移到核内与抗菌肽基因的启动子元件结合启动包括 defensin, drosomycin, cecropin 在内的抗菌肽的表达(图 2) (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Aggarwal and Silverman, 2008; Feldhaar and Gross, 2008)。目前仅在果蝇、烟草天蛾、家蚕和黄粉虫得到了有功能的 Spz 蛋白，它们的前体分别被果蝇 SPE (Spätzle-processing enzyme)、烟草天蛾 HP8、家蚕 BAEEase 和黄粉虫 SPE 激活(Kim *et al*., 2008; An *et al*., 2009)。值得注意的是烟草天蛾 HP8 酶原在信号途径中是被上面黑化反应中提到的另一丝氨酸蛋白酶 HP6 激活的(An *et al*., 2009)。这意味着 HP6 同时参与了黑化反应和抗菌肽的产生两种途径。同样的现象也发生在黄粉虫中，SPE 可以同时激活酚氧化酶原和 Spz 前体(Kim *et al*., 2008)。

3.2.2 Imd 途径：该途径能够有效抵御革兰氏阴性菌的侵染，但是对其发生机制的研究远远不如 Toll 途径透彻。目前对果蝇 Imd 途径的研究表明：革兰氏阴性菌表面的 DAP-型肽聚糖与胞外 PGRP-LE、细胞跨膜受体 PGRP-LC 结合，信号通过一个未知的过程传给接头蛋白 Imd。然后，包括 κB 激酶复合物(IKK)和 caspase 在内的一系列反应导致了 Relish 被切割(Lemaitre and Hoffmann, 2007; Aggarwal and Silverman, 2008)。Relish 中的 Rel 区域进入细胞核进一步诱导抗菌肽的转录表达。当果蝇被注射大肠杆菌后，抗菌肽 Diptericin 基因的表达就是通过 Imd 途径产生的(Kim *et al*., 2006)。通过对测序基因组的分析，在冈比亚按蚊、家蚕、赤拟谷盗等昆虫中也鉴定到与果蝇 Imd 通路同类的基因(orthologous genes) (Evans *et al*., 2006; Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008)。

4 细胞免疫和体液免疫的相互作用

虽然上述将昆虫天然免疫反应分为细胞免疫和体液免疫两种，其实，这种简单的划分似乎有些武断，因为在抵御外源物侵染的过程中，细胞免疫和体液免疫实际上是相互交叉，紧密联系在一起的，有时很难对这两种免疫类型做出明确区分。

其次，体液免疫和细胞免疫的发生过程与效应分子是相互交叉的。昆虫杀灭和清除外源物的过程不能单独依赖某一反应，而是需要上述提到的各种反应共同作用抵御外界侵染。当昆虫受到外界病原物的侵染时，会在侵染部位诱导包囊和黑化作用，从而阻止病原物的繁殖与扩散，之后昆虫体内具有吞噬作用的细胞会将病原物消除，对于个体较大的寄生物，昆虫体内会形成结节，从而将寄生物封包起来，伴随着这一系列反应还有引发昆虫体内的脂肪体合成抗菌肽杀灭外源物(Jiang *et al*., 2010)。例如，黑化反应和吞噬作用这两个过程都依赖共同的底物(酪氨酸、多巴、多巴胺等)和一些关键酶[酚氧化酶和多巴脱羧酶(dopa decarboxylase, Ddc)等](Marmaras and Lampropoulou, 2009)。类似地，集结作用和黑化作用也是既有区别又互相使用相同的底物和一些酶。其实，仅就酚氧化酶原激活这一过程，就同时参与了黑化反应、吞噬作用、集结作用、伤口愈合等多个免疫反应(Jiang *et al*., 2010)。

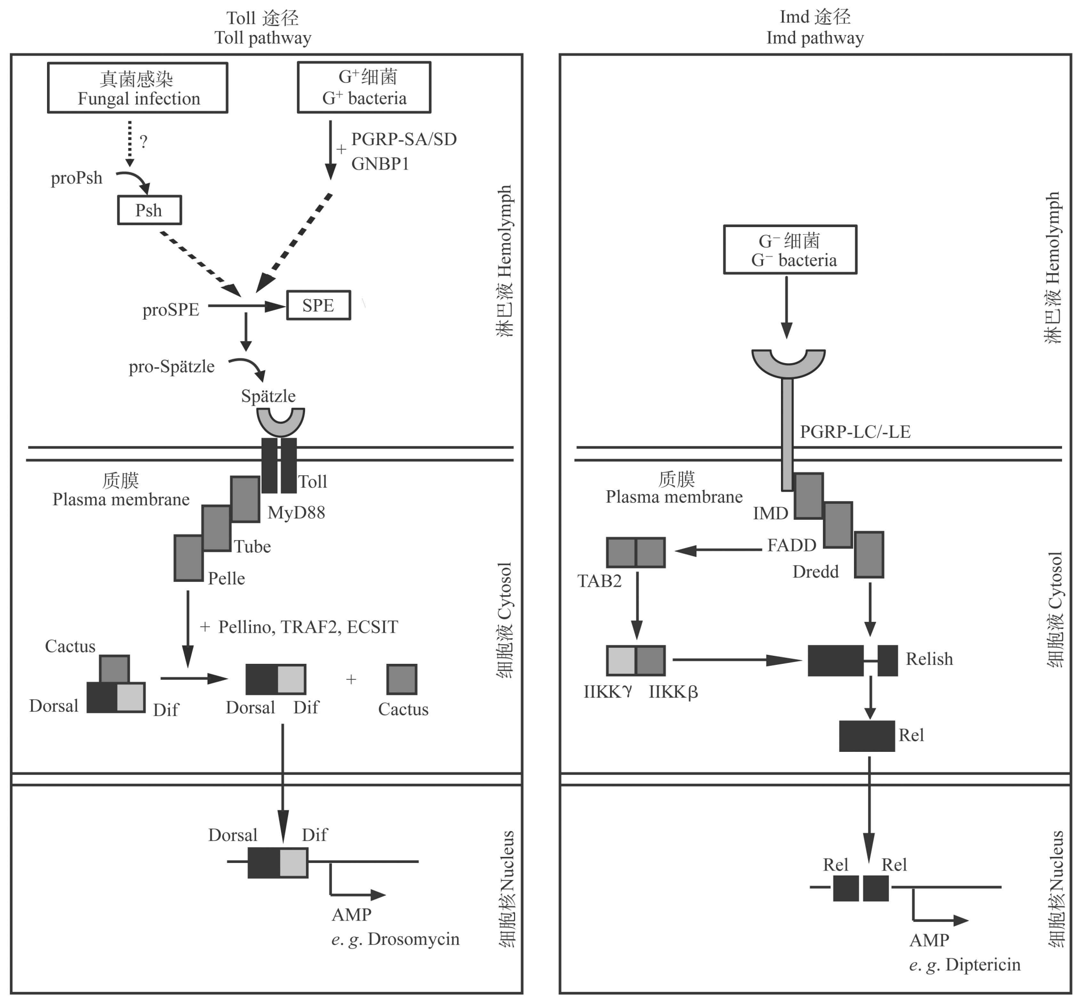


图 2　黑腹果蝇的 Toll 途径和 Imd 途径示意图

Fig. 2　Sketch map of the Toll and Imd pathway in *Drosophila melanogaster*

5　结语

昆虫天然免疫反应是一个非常有趣且引人关注的研究领域，尤其是它与哺乳动物天然免疫反应机制也具有一定的相似性（Silverman and Maniatis, 2001；Kim and Kim, 2005），因而通过进行分子生物学与生物化学等研究，阐明昆虫体内天然免疫反应的分子机制以及各个分子在天然免疫中的调控作用，也可为理解更复杂的高等动物天然免疫反应提供一些相关的研究线索。另一方面，对昆虫天然免疫的研究有利于更好地理解昆虫自身的免疫系统，为保护益虫以及防治害虫提供重要依据。这在注重生态发展而抗药性和农药残留日益严重的今天无疑具有十分重要的意义。

参考文献（References）

Aggarwal K, Silverman N, 2008. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB Rep.*, 41(4): 267–277.

An C, Budd A, Kanost MR, Michel K, 2011. Characterization of a regulatory unit that controls melanization and affects longevity of mosquitoes. *Cell Mol. Life Sci.*, 68(11): 1929–1939.

An C, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang H, Kanost MR, 2009. Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways. *J. Biol. Chem.*, 284(29): 19716–19726.

An C, Kanost MR, 2010. *Manduca sexta* serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the Toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(9): 683–689.

Basbous N, Coste F, Leone P, Vincentelli R, Royet J, Kellenberger C, Roussel A, 2011. The *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LF interacts with peptidoglycan-recognition protein LC to downregulate the Imd pathway. *EMBO Rep.*, 12(4): 327–333.

Daffre S, Faye I, 1997. Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig-superfamily. *FEBS Lett.*, 408(2): 127–130.

Eleftherianos I, Gökçen F, Felfoldi G, Millichap PJ, Trenczek TE, Ffrench-Constant RH, Reynolds SE, 2007. The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to

bacteria in the insect *Manduca sexta*. *Cell Microbiol*., 9(5): 1137-1147.

Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol*., 15(5): 645-656.

Fabrick JA, Baker JE, Kanost MR, 2004. Innate immunity in a pyralid moth: functional evaluation of domains from a beta-1,3-glucan recognition protein. *J. Biol. Chem*., 279(25): 26605-26611.

Feldhaar H, Gross R, 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes Infect*., 10(9): 1082-1088.

Gettins PG, 2002. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev*., 102(12): 4751-4804.

Gorman MJ, Wang Y, Jiang H, Kanost MR, 2007. *Manduca sexta* hemolymph proteinase 21 activates prophenoloxidase-activating proteinase 3 in an insect innate immune response proteinase cascade. *J. Biol. Chem*., 282(16): 11742-11749.

Gupta S, Wang Y, Jiang H, 2005. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 35(3): 241-248.

Hernandez-Martinez S, Lanz H, Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Tsutsumi V, 2002. Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol*., 39(1): 61-69.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA, 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418): 1313-1318.

Hughes AL, 2012. Evolution of the betaGRP/GNBP/beta-1,3-glucanase family of insects. *Immunogenetics*, 64(7): 549-558.

Hultmark D, 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr. Opin. Immunol*., 15(1): 12-19.

Iwanaga S, Kawabata S, Muta T, 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J. Biochem*., 123(1): 1-15.

Jiang H, Kanost MR, 1997. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem*., 272(2): 1082-1087.

Jiang H, Kanost MR, 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 30(2): 95-105.

Jiang H, Ma C, Lu ZQ, Kanost MR, 2004. Beta-1,3-glucan recognition protein-2 (betaGRP-2) from *Manduca sexta*; an acute-phase protein that binds beta-1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 34(1): 89-100.

Jiang H, Vilcinskas A, Kanost MR, 2010. Immunity in lepidopteran insects. *Adv. Exp. Med. Biol*., 708: 181-204.

Jiang H, Wang Y, Yu XQ, Kanost MR, 2003. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*. A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains. *J. Biol. Chem*., 278(6): 3552-3561.

Kaneko T, Silverman N, 2005. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cell Microbiol*., 7(4): 461-469.

Kanost MR, 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol*., 23(4(5): 291-301.

Kim CH, Kim SJ, Kan H, Kwon HM, Roh KB, Jiang R, Yang Y, Park JW, Lee HH, Ha NC, Kang HJ, Nonaka M, Söderhäll K, Lee BL, 2008. A three-step proteolytic cascade mediates the activation of the peptidoglycan-induced toll pathway in an insect. *J. Biol. Chem*., 283(12): 7599-7607.

Kim M, Lee JH, Lee SY, Kim E, Chung J, 2006. Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(44): 16358-16363.

Kim T, Kim YJ, 2005. Overview of innate immunity in *Drosophila*. *J. Biochem. Mol. Biol*., 38(2): 121-127.

Kim YS, Ryu JH, Han SJ, Choi KH, Nam KB, Jang IH, Lemaitre B, Brey PT, Lee WJ, 2000. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Biol. Chem*., 275(42): 32721-32727.

Lamprou I, Mamali I, Dallas K, Fertakis V, Lampropoulou M, Marmaras VJ, 2007. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology*, 121(3): 314-327.

Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M, 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol*., 230(2): 243-257.

Lavine MD, Strand MR, 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *J. Insect Physiol*., 47(9): 965-974.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 32(10): 1295-1309.

Lavine MD, Strand MR, 2003. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits. *Insect Mol. Biol*., 12(5): 441-452.

Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol*., 25: 697-743.

Leon LJ, Idangodage H, Wan CP, Weers PM, 2006. Apolipophorin Ⅲ: lipopolysaccharide binding requires helix bundle opening. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 348(4): 1328-1333.

Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC, 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 104(5): 709-718.

Ma C, Kanost MR, 2000. A beta1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J. Biol. Chem*., 275(11): 7505-7514.

Marmaras VJ, Lampropoulou M, 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal*, 21(2): 186-195.

Mavrouli MD, Tsakas S, Theodorou GL, Lampropoulou M, Marmaras VJ, 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1744(2): 145-156.

Montaño AM, Tsujino F, Takahata N, Satta Y, 2011. Evolutionary

origin of peptidoglycan recognition proteins in vertebrate innate immune system. *BMC Evol. Biol.*, 11: 79.

Muta T, Iwanaga S, 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 8(1): 41 – 47.

Nappi AJ, Ottaviani E, 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22(5): 469 – 480.

Ning YY, You MS, Wang CS, 2009. Advances in the mechanisms of insect immune recognition and pathogen immune escape. *Acta Entomologica Sinica*, 52(5): 567 – 575. [宁媛媛，尤民生，王成树，2009. 昆虫免疫识别与病原物免疫逃避机理研究进展. 昆虫学报，52(5): 567 – 575]

Ochiai M, Ashida M, 1988. Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 263(24): 12056 – 12062.

Silverman N, Maniatis T, 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes. Dev.*, 15(18): 2321 – 2342.

Sumathipala N, Jiang H, 2010. Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(6): 487 – 495.

Sun D, Ziegler R, Milligan CE, Fahrbach S, Schwartz LM, 1995. Apolipophorin Ⅲ is dramatically up-regulated during the programmed death of insect skeletal muscle and neurons. *J. Neurobiol.*, 26(1): 119 – 129.

Tong Y, Jiang H, Kanost MR, 2005. Identification of plasma proteases inhibited by *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 and their association with components of the prophenol oxidase activation pathway. *J. Biol. Chem.*, 280(15): 14932 – 14942.

Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190): 949 – 955.

Wang Y, Jiang H, 2007. Reconstitution of a branch of the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation cascade in vitro: snake-like hemolymph proteinase 21 (HP21) cleaved by HP14 activates prophenoloxidase-activating proteinase-2 precursor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(10): 1015 – 1025.

Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D, 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(25): 13772 – 13777.

Williams MJ, 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.*, 178(8): 4711 – 4716.

Yao HP, Wu XF, 2008. Advances in insect hemolin structure and function. *Acta Entomologica Sinica*, 51(1): 530 – 536. [姚慧鹏，吴小锋，2008. 昆虫类免疫球蛋白结构和功能研究进展. 昆虫学报，51(1): 530 – 536]

Yu XQ, Kanost MR, 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.*, 28(9): 891 – 900.

Zhu Y, Wang Y, Gorman MJ, Jiang H, Kanost MR, 2003. *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *J. Biol. Chem.*, 278(47): 46556 – 46564.

Zhuang S, Kelo L, Nardi JB, Kanost MR, 2007. An integrin-tetraspanin interaction required for cellular innate immune responses of an insect, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 282(31): 22563 – 22572.

（责任编辑：赵利辉）